

## **BAB IV**

### **PROSEDUR PENELITIAN**

#### **4.1 Pengumpulan Bahan**

Pengumpulan bahan meliputi pengambilan dan determinasi bahan tanaman serta penyiapan simplisia.

##### **4.1.1 Pengambilan dan Determinasi Bahan Tanaman**

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit buah rambutan matang yang diperoleh dari Kec. Cipeundeuy, Jawa Barat yang merupakan salah satu sentra produksi rambutan terbesar. Determinasi tanaman rambutan dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Universitas Padjajaran (UNPAD), Jatinangor.

##### **4.1.2 Penyiapan Simplisia**

Kulit buah rambutan yang matang dicuci dan dibersihkan dengan air mengalir hingga bersih dan dipotong tipis-tipis lalu dikeringkan, tidak dibawah sinar matahari langsung (Syamsidi, 2014:1-9 ) hingga didapat 1 kg kulit rambutan kering.

#### **4.2 Karakterisasi Mutu Simplisia**

Karakterisasi mutu simplisia meliputi penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam dan penetapan kadar air.

##### **4.2.1 Kadar Abu Total**

Simplisia diserbuk kasar lalu ditimbang sebanyak 1 g. Kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Lalu dipijarkan perlahan diatas

*hot plate* hingga arang habis, dinginkan dan ditimbang. Jika arang tidak hilang maka tambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Kemudian sisa dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan dengan tanur bersuhu 550°C hingga bobot tetap, dinginkan krus ke dalam desikator selama 10 menit, kemudian ditimbang. Kadar abu total (%) dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Dirjen POM, 1979:155).

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{berat abu (gram)}}{\text{bobot sampel awal (gram)}} \times 100 \%$$

#### 4.2.2 Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 ml asam sulfat encer selama 5 menit, dikumpulkan bagian yang tidak larut asam, lalu disaring melalui kertas saring abus, dicuci dengan air panas, kemudian dipijarkan sampai bobot tetap, dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (DepKes RI, 2000:17).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu (gram)}}{\text{bobot sampel awal (gram)}} \times 100 \%$$

#### 4.2.3 Kadar Air

Tabung penampung dan kondensor yang telah dibilas dan kering, dimasukkan 200 ml toluen yang telah dijenuhkan dengan aquadest sebanyak 2-3 ml. Kemudian sampel ( $\pm 25$  g simplisia) dimasukkan ke dalam labu bundar. Labu dididihkan secara perlahan – lahan selama  $\pm 15$  menit (ditambahkan serpihan porselen), setelah mendidih disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air

tersuling, kemudian pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar. Tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima dihilangkan. Air dan toluene dibiarkan memisah dalam tabung penerima, kemudian volume air dalam tabung penerima diamati. Kadar air dihitung dalam persen (%) (Depkes RI, 2000:14).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{ml air} \times \text{BJ air} \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right)}{\text{g simplisia}} \times 100 \%$$

#### 4.3 Skrining Fitokimia Simplisia

a. Senyawa polifenolat :

Simplisia ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya. Kemudian dipanaskan diatas penangas air dan disaring. Filtrat ditambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966:256-264).

b. Senyawa flavonoid :

Simplisia ditambahkan 100 ml air panas dan dididihkan selama 10 menit. Campuran disaring, filtrat ditampung sebagai **larutan A**. 5 ml larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat. Lalu ditambahkan amilakohol, kocok dengan kuat. Biarkan sampai terjadi pemisahan. Terbentuknya warna dalam lapisan amilalkohol

menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid (Dirjen POM,1978:168 & Farnsworth, 1966:257).

c. Senyawa saponin :

**Larutan A** dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kocok secara vertikal selama 10 detik. Lalu dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa 1 cm yang stabil didalam tabung reaksi menunjukkan adanya golongan senyawa saponin dan busa tersebut masih bertahan setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2 N (Ditjen POM, 1978:167 & Farnsworth, 1966:257).

d. Senyawa tanin :

Simplisia ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 15 menit. Kemudian didinginkan, lalu disaring dan filtrat dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi yang berbeda.

**Filtrat pertama** : ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1 %. Terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa golongan tannin.

**Filtrat kedua** : ditambahkan larutan gelatin 1 %. Terbentuknya warna biru tua atau hitam ke hijauan menunjukkan adanya senyawa golongan tannin.

**Filtrat ketiga** : ditambahkan 15 ml pereaksi Steasny, dipanaskan di atas penangas. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tannin katekat. Lalu disaring, filtrat di jenuhkan dengan penambahan natrium asetat, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1 %. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tannin galat (Fransworth, 1966:264).

- e. Senyawa triterpenoid dan steroid :

Simplisia digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguapan dan dibiarkan menguap sampai kering. Lalu ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard. Terjadinya warna merah ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:257).

- f. Monoterpena dan seskuiterpena :

Simplisia digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguapan dan dibiarkan menguap sampai kering. Lalu ditambahkan larutan vanillin 10 % dalam HCL pekat. Timbulnya warna – warna menandakan positif senyawa mono dan seskuiterpen.

#### 4.4 Ekstraksi Simplisia

Ekstraksi menggunakan cara dingin dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95 %. Penggantian pelarut dalam suhu kamar dilakukan setiap 24 jam sebanyak 3 kali. Serbuk kulit buah rambutan sebanyak 1 kg dimasukkan dalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut etanol 95 % sampai seluruh serbuk terendam. Lalu didiamkan selama 24 jam, pengadukan dilakukan setiap 4 jam sekali. Setelah 24 jam ekstrak ditampung dan dilakukan maserasi ulang.

Setelah proses ekstraksi, selanjutnya ekstrak kulit buah rambutan dikentalkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada tekanan rendah dan suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental.

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \times 100 \%$$

#### 4.4.1 Skrining Fitokimia Ekstrak

Skrining fitokimia ekstrak dilakukan dengan prosedur yang sama pada skrining fitokimia simplisia kulit buah rambutan. Dapat dilihat pada sub bab 4.3.

#### 4.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Rambutan

##### a. Sterilisasi alat dan media

Sterilisasi alat dan media pertumbuhan bakteri dilakukan dengan cara panas lembab menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan jarum ose disterilisasi dengan cara fiksasi pada nyala api bunsen (Atlas, 2010:8).

##### b. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

Media dibuat dengan cara melarutkan 42 gr NA ke dalam 1500 ml aquades steril dalam erlenmeyer. Larutan ini selanjutnya dipanaskan diatas kompor listrik sambil diaduk-aduk selama 10 - 15 menit, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Atlas, 2010:1303).

##### c. Penyiapan bakteri uji

Tiap bakteri uji yaitu *E. coli* dan *S. aureus* dibiakkan pada media pertumbuhan NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 - 24 jam.

##### d. Pensuspensian bakteri uji

Pensuspensian bakteri uji dilakukan dengan mengumpulkan biakan yang terdapat pada permukaan media agar miring ke dalam 10 ml larutan NB

(*Nutrient Broth*) steril. Kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 16 - 24 jam.

e. Penentuan KHM

Penentuan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dengan metode difusi (sumur) (Jawetz, *et. al.*, 2001:168). 20 ml NA dicairkan dan dibiarkan mencapai suhu  $\pm$  45-53°C, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril yang sudah berisi suspensi bakteri sebanyak 0,3 ml. Campuran kemudian diputar hingga homogen dan dibiarkan selama beberapa menit sehingga menjadi padat. Buat lubang atau sumur pada media agar dengan menggunakan perforator. Ekstrak kulit buah rambutan yang telah diencerkan dengan propilenglikol dimasukkan dengan berbagai konsentrasi yaitu 2 ; 2,5 dan 3 % ke dalam sumur pada media agar sebanyak 50  $\mu$ l. Lalu dibiarkan selama 1 jam pada suhu ruangan (prainkubasi). Cawan petri kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 16 - 24 jam.

**Tabel IV.1** Klasifikasi Respon Hambatan

Diameter zona bening (mm)	Respon hambatan pertumbuhan
$\leq$ 10	Tidak ada
11-15	Lemah
16-20	Sedang
$>$ 20	Kuat

Sumber : Greenwood,1995 dalam Rinawati, 2014:3

#### 4.5 Formulasi Gel

Pada penelitian ini formulasi gel dibuat dengan variasi *gelling agent*. Formula 1 menggunakan basis Carbopol 940 sedangkan formula 2 menggunakan basis CMC-Na. Formula 1 berdasarkan hasil penelitian Sari dan Isadiartuti (2006) yang menggunakan Carbopol 940 sebagai basis gel antiseptik dimana gel yang diperoleh memiliki kestabilan penyimpanan selama 1 bulan. Sedangkan formula 2 berdasarkan hasil penelitian Maswadeh, *et. al.*, (2006:277-280) menggunakan CMC-Na sebagai basis gel yang memiliki kestabilan selama 1 bulan penyimpanan dan pH yang sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5 -6,5 selama 1 bulan penyimpanan.

##### 1. Formula 1

Karbopol dikembangkan dengan sebagian aquades panas. Trietanolamin (TEA) dimasukkan tetes demi tetes ke dalam karbopol yang telah dikembangkan (campuran A) hingga mencapai pH 6. Kemudian natrium metabisulfid dilarutkan dalam sebagian gliserin (campuran B). Kemudian ekstrak kulit buah rambutan dimasukkan ke dalam campuran B dan digerus homogen. Kemudian campuran A ditambahkan dengan campuran B dan digerus homogen. Kemudian dimasukkan sisa aquades, diaduk hingga membentuk massa gel yang homogen (Sari dan Isadiartuti, 2006:163-169).

**Tabel IV.2** Formula gel antiseptik ekstrak metanol daun kesum

Bahan	Jumlah (%)
Ekstrak etanol daun kesum	15
Karbopol 940	0,5
TEA	0,5
Gliserin	10
Natrium metabisulfit	0,2
Aquades ad	100

Sumber: Sari dan Isadiartuti, 2006

**Tabel IV.2** merupakan formula gel antiseptik ekstrak metanol daun kesum yang dijadikan literatur formulasi pada penelitian ini. **Tabel IV.3** sama dengan **Tabel IV.2** dengan penggunaan zat aktif yang berbeda serta jumlah sediaan yang berbeda.

**Tabel IV.3** Formula gel *handsanitizer* ekstrak kulit buah rambutan

Bahan	Jumlah (%)
Ekstrak kulit buah rambutan	x
Karbopol 940	0,5
TEA	0,5
Gliserin	10
Natrium metabisulfit	0,2
Aquades ad	100

## 2. Formula 2

Ekstrak kulit buah rambutan dilarutkan ke dalam sebagian aquades kemudian dipanaskan sambil diaduk (campuran A). Kemudian sedikit demi sedikit CMC-Na dikembangkan dalam air panas sambil terus diaduk dan jangan sampai menggumpal (campuran B). Campuran A dicampurkan dengan campuran B lalu ditambahkan gliserin dan ditambahkan propilenglikol dan air. Dilakukan pengadukan sampai terbentuk gel. Setelah terbentuk, gel disimpan pada tempat yang gelap dan dingin selama 1 malam (10-15°C) (Maswadeh, *et. al.*, 2006: 277-280).

**Tabel IV.4** Formula standar basis gel CMC-Na

Bahan	Jumlah (%)
CMC-Na	5
Gliserin	10
Propilenglikol	5
Aquades ad	100

Sumber : Maswadeh, *et. al.*, 2006: 277-280

**Tabel IV.4** merupakan formula standar basis gel CMC-Na yang dijadikan literatur pada penelitian ini. **Tabel IV.5** formula yang sama dengan **Tabel IV.4** dengan penggunaan zat aktif yang berbeda serta jumlah sediaan yang berbeda.

**Tabel IV.5** Formula sediaan gel *handsanitizer* ekstrak kulit buah rambutan

Bahan	Jumlah (%)
Ekstrak kulit buah rambutan	x
CMC-Na	5
Gliserin	10
Propilenglikol	5
Aquades ad	100

#### 4.5.1 Evaluasi Sediaan Gel

##### 1. Pengujian Organoleptis

Pengamatan dilihat secara langsung bentuk, warna, dan bau dari gel yang dibuat. Gel biasanya jernih dengan konsistensi setengah padat (Ansel, 1989).

##### 2. Viskositas

Viskositas sediaan gel diukur menggunakan Viskometer *Brookfield RV* untuk sediaan semisolid dengan cara sampel dimasukkan ke dalam wadah, lalu dipilih spindle no. 14 dan dimasukkan dalam wadah hingga tanda batas dan rotor dihidupkan, dibiarkan selama beberapa waktu hingga didapat angka yang stabil.

##### 3. Homogenitas

Caranya dengan mengoleskan sedikit gel diatas kaca objek dan diamati susunan partikel yang terbentuk atau ketidak homogenan.

#### 4. Penentuan pH

Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan alat pH meter *Mettle Toledo* yang dicelupkan ke dalam sampel gel yang telah diencerkan. Kemudian alat dibiarkan hingga menunjukkan harga pH sampai konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter merupakan harga pH sediaan.

#### 5. Daya Sebar

Sampel gel sebanyak 0,5 g diletakkan di pusat antara dua kaca arloji, dimana kaca arloji sebelah atas dibebani dengan meletakkan anak timbangan sehingga mencapai bobot 1, 2 dan 5 g. Pengukuran dilakukan hingga diameter penyebaran gel konstan.

**Tabel IV.6** Kriteria daya sebar sediaan gel

Kriteria	Keterangan
Sukar menyebar	< 3 cm
Mudah menyebar	3-5 cm
Sangat mudah menyebar	> 5 cm

Sumber : Garg, *et. al.*, 2002 :84-104

#### 6. Uji Waktu Kering

Responden tidak menggunakan produk sejenis dan sebelum melakukan percobaan tidak boleh memakai pelembab tangan. Uji waktu kering dilakukan dengan cara mengoleskan gel ke telapak tangan dan diamati waktu yang diperlukan sediaan untuk mengering, yaitu waktu dari saat mulai dioleskannya

gel hingga benar-benar hilangnya lapisan sediaan yang dioleskan tersebut. Setiap subyek diberikan sediaan 1 ml dan diusapkan pada tangan hingga kering. Direplikasi 3 kali per menit. Menggunakan alat bantu stopwatch. Kemudian waktu tersebut dibandingkan dengan waktu kering gel produk inovator yang beredar di pasaran yaitu sekitar 15 – 30 detik. Pengujian dilakukan selama waktu penyimpanan (Vieira, *et. al.*, 2009:515-525).

#### 4.5.2 Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Gel

Uji aktivitas antibakteri sediaan gel dilakukan dengan menggunakan metode difusi (sumur) terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. 20 ml NA dicairkan dan dibiarkan mencapai suhu  $\pm 45-53^{\circ}\text{C}$ , kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril yang sudah berisi suspensi bakteri sebanyak 0,3 ml. Campuran kemudian digoyang hingga homogen dan dibiarkan selama beberapa menit sehingga menjadi padat. Selanjutnya dibuat 4 buah lubang atau sumur pada media agar dengan menggunakan perforator. Lubang ke satu dimasukkan gel ekstrak kulit buah rambutan 3 % yang telah diencerkan dengan propilenglikol. Lubang ke dua dimasukkan gel *handsanitizer* tanpa ekstrak. Lubang ke tiga dimasukkan sediaan *handsanitizer* dengan konsentrasi ekstrak 0,5 %. Lubang ke empat dimasukkan sediaan *handsanitizer* dengan konsentrasi ekstrak 1 %. Masing-masing lubang diisi sebanyak 100  $\mu\text{l}$ . Lalu dibiarkan selama 1 jam pada suhu ruangan (prainkubasi). Cawan petri kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 16 - 24 jam (Jawetz, *et. al.*, 2001:168).

### 4.5.3 Uji Efektivitas Daya Antiseptik

Untuk mengetahui pengurangan bakteri yang terdapat di tangan dilakukan dengan cara menggunakan responden yang bersedia diperiksa jumlah bakteri yang terdapat pada tangannya. Kondisi tangan responden harus sehat dan tidak alergi terhadap sampel yang akan diuji. Setiap sampel menggunakan 6 orang responden yang berbeda. Uji efektivitas daya antiseptik dilakukan dengan menggunakan metode replika:

- a. Perhitungan angka bakteri yang terdapat pada tangan sebelum dibersihkan dengan *handsanitizer*. Pemeriksaan dilakukan menurut cara Slack, *et. al.*, (1971:111) dengan beberapa modifikasi. Sebelum diperiksa kedua telapak tangan responden saling digosok-gosokkan supaya kandungan bakteri di kedua telapak tangannya homogen, kemudian dengan swab kapas steril yang telah dibasahi dengan larutan NaCl 0,9% diusapkan atau disapukan dengan cukup kuat pada telapak tangan responden, berlawanan arah dengan garis telapak tangan. Swab kapas tersebut kemudian diusapkan di atas pelat media NA dalam cawan petri, secara merata dan menyeluruh. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu koloni bakteri yang tumbuh dihitung dan dicatat (Radji, dkk., 2007:3-4).
- b. Perhitungan angka bakteri yang terdapat pada tangan yang telah dibersihkan dengan *handsanitizer*. Pemeriksaan dilakukan menurut cara Slack, *et. al.*, (1971:111) dengan beberapa modifikasi. Setelah percobaan diatas dilakukan, maka telapak tangan responden segera dibersihkan dengan cairan

*handsanitizer* sesuai dengan petunjuk penggunaan pada masing-masing produk uji. Setelah 35 detik swab kapas steril yang telah dibasahi dengan larutan NaCl 0,9% diusapkan dengan cukup kuat pada telapak tangan responden yang telah dibersihkan, dengan berlawanan arah dengan garis telapak tangan. Swab kapas tersebut kemudian diusapkan di atas lempeng media NA dalam cawan petri, secara merata dan menyeluruh. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi diamati dan koloni bakteri yang tumbuh dihitung dan dicatat (Radji, dkk., 2007:3-4).

c. Pengujian Kesukaan Responden dengan Metode Uji Organoleptik

Para responden akan mengisi angket / kuisisioner mengenai kualitas gel terkait contoh kuisisioner dapat dilihat pada **Lampiran 10**. Uji kesukaan ini meliputi parameter kekentalan gel, warna, aroma, kesan saat dan setelah pemakaian. Kemudian responden mengisi *informed consent* dapat dilihat pada **Lampiran 11**.